



(19) BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

(12) Übersetzung der  
europäischen Patentschrift

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>:  
C 12 P 13/04

(87) EP 0 249 188 B1

(10) DE 37 50 523 T 2

DE 37 50 523 T 2

(21) Deutsches Aktenzeichen:	37 50 523.8
(86) Europäisches Aktenzeichen:	87 108 292.1
(86) Europäischer Anmeldetag:	9. 6. 87
(87) Erstveröffentlichung durch das EPA:	16. 12. 87
(87) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA:	14. 9. 94
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt:	2. 2. 95

(30) Unionspriorität: (32) (33) (31)

09.06.86 JP 131743/86	23.01.87 JP 12513/87
30.03.87 JP 74476/87	25.04.87 JP 101152/87

(73) Patentinhaber:

Meiji Seika Kaisha Ltd., Tokio/Tokyo, JP

(74) Vertreter:

Popp, E., Dipl.-Ing. Dipl.-Wirtsch.-Ing. Dr. rer. pol.;  
Sajda, W., Dipl.-Phys.; Reinländer, C., Dipl.-Ing.  
Dr.-Ing.; Bohnenberger, J., Dipl.-Ing. Dr. phil. nat.,  
80538 München; Bolte, E., Dipl.-Ing.; Möller, F.,  
Dipl.-Ing., Pat.-Anwälte, 28209 Bremen

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, DE, ES, FR, GB, IT, LI, LU, NL, SE

(72) Erfinder:

Imai, Satoshi c/o MEIJI SEIKA KAISHA LTD,  
Saiwai-ku Kawasaki-shi Kanagawa-ken, JP; Takane,  
Nobuhiko c/o MEIJI SEIKA KAISHA LTD, Saiwai-ku  
Kawasaki-shi Kanagawa-ken, JP; Yoshizawa,  
Yachiyo c/o MEIJI SEIKA KAISHA LTD, Saiwai-ku  
Kawasaki-shi Kanagawa-ken, JP; Saito, Toshinori  
c/o MEIJI SEIKA KAISHA LT, Saiwai-ku

Kawasaki-shi Kanagawa-ken, JP; Ogawa, Hiroshi  
c/o MEIJI SEIKA KAISHA LTD, Saiwai-ku  
Kawasaki-shi Kanagawa-ken, JP; Takabe, Hidehi c/o  
MEIJI SEIKA KAISHA LTD, Saiwai-ku Kawasaki-shi  
Kanagawa-ken, JP; Sato, Atsuyuki c/o MEIJI SEIKA  
KAISHA LTD, Saiwai-ku Kawasaki-shi  
Kanagawa-ken, JP; Fukatsu, Shunzo c/o MEIJI  
SEIKA KAISHA LTD, Saiwai-ku Kawasaki-shi  
Kanagawa-ken, JP; Okada, Akira c/o MEIJI SEIKA  
KAISHA LTD, Saiwai-ku Kawasaki-shi  
Kanagawa-ken, JP; Murakami, Takeshi c/o MEIJI  
SEIKA KAISHA LTD, Kohhoku-ku Yokohama-shi  
Kanagawa-ken, JP; Hara, Osamu c/o MEIJI SEIKA  
KAISHA LTD, Kohhoku-ku Yokohama-shi  
Kanagawa-ken, JP; Miyado, Shinji c/o MEIJI SEIKA  
KAISHA LTD, Kohhoku-ku Yokohama-shi  
Kanagawa-ken, JP; Kumada, Yoichi c/o MEIJI  
SEIKA KAISHA LTD, Kohhoku-ku Yokohama-shi  
Kanagawa-ken, JP; Anzai, Hiroyuki c/o MEIJI SEIKA  
KAISHA LTD, Kohhoku-ku Yokohama-shi  
Kanagawa-ken, JP; Nagaoka, Kozo c/o MEIJI SEIKA  
KAISHA LTD, Kohhoku-ku Yokohama-shi  
Kanagawa-ken, JP

(54) Verfahren zur Herstellung von L-2-Amino-4-(hydroxymethyl-phosphinyl)-Buttersäure.

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II 5 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wird vom Deutschen Patentamt inhaltlich nicht geprüft.

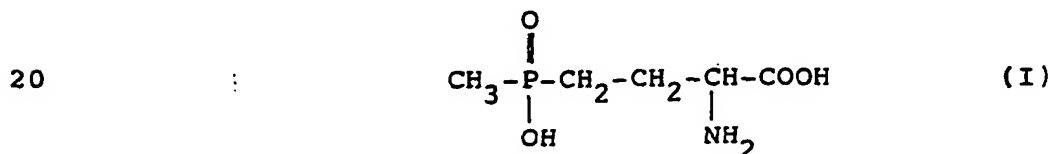
DE 37 50 523 T 2

Verfahren zur Herstellung von L-2-Amino-4-(hydroxymethylphosphinyl)-Buttersäure

Die Erfindung betrifft ein neues Verfahren zur Herstellung von L-2-Amino-4-(hydroxymethylphosphinyl)-Buttersäure, die Aktivitäten als Unkrautvertilgungsmittel bzw. Herbizid zeigt und von der bekannt ist, daß sie als Herbizid brauchbar ist (siehe die JP-Patentveröffentlichung Nr. 56210/86 oder die US-PS 4 265 654), gemäß der Definition im Oberbegriff des Patentanspruchs 1 (GB-A-2 161 159).

Hintergrund der Erfindung

Die bekannten Verfahren zur Herstellung von L-2-Amino-4-(hydroxymethylphosphinyl)-Buttersäure (nachstehend "L-AMPB" abgekürzt), die durch die folgende Formel (I) repräsentiert ist:



umfassen ein Verfahren, bei dem eine antibiotische Substanz SF-1293, d. h. L-2-Amino-4-(hydroxymethylphosphinyl)-butyryl-L-alanyl-L-alanin, die L-AMPB als eine Komponente des SF-1293-Moleküls enthält und als Herbizid wirksam ist (auch "Bialaphos" genannt; siehe JP-Patentveröffentlichung Nr. 639/76 und US-PS-4 309 208), der Hydrolyse unterworfen wird (siehe die JP-Patentanmeldung, Erstveröffentlichung "Kokai" 85538/73), und ein Verfahren, bei dem die SF-1293-Substanz mit einem mikrobiellen Enzym abgebaut wird (siehe die JP-Patentanmeldung, Erstveröffentlichung "Kokai" 31890/74). Außerdem ist ein weiteres Verfahren bekannt, bei dem AMPB in Form einer racemischen Mischung zuerst in einem chemischen Syntheseverfahren hergestellt wird (siehe die JP-Patentanmeldung, Erstveröffentlichung "Kokai" 91019/73 und

84529/79), woraufhin das racemische AMPB-Produkt mit Hilfe eines mikrobiellen Enzyms der optischen Auflösung unterzogen wird, um L-AMPB zu ergeben. Außerdem ist ein weiteres Verfahren bekannt, das durch die Erfinder der vorliegenden Anmeldung vor einiger Zeit veröffentlicht wurde, wobei ein L-AMPB produzierender Stamm der Gattung Streptomyces gezüchtet wird, gefolgt von der Rückgewinnung von L-AMPB direkt aus dem resultierenden Nährboden (siehe die JP-Patentanmeldung, Erstveröffentlichung "Kokai" 47485/82).

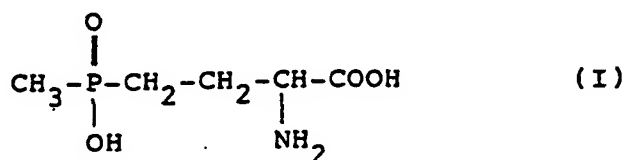
Damit ein Stoff mit Herbizid-Aktivität, wie etwa L-AMPB hergestellt, untersucht und als Herbizid entwickelt und schließlich als großtechnisches Herbizidprodukt auf den Markt gebracht werden kann, müssen unbedingt Untersuchungen durchgeführt werden, um das Herstellungsverfahren der Herbizid-Substanz so zu verbessern, daß das Verfahren für die wirtschaftliche und großtechnische Herstellung geeignet ist, während gleichzeitig erhebliche Forschungs- und Entwicklungsarbeiten durchgeführt werden müssen, um die Sicherheit und die Herbizid-Wirkung der Substanz zu steigern. Die durch den vorstehend beschriebenen chemischen Syntheseprozess hergestellte AMPB ist ein Gemisch aus L-AMPB und D-AMPB. D-AMPB selbst hat jedoch im wesentlichen keine Herbizid-Wirksamkeit. Außerdem ist D-AMPB eine nichtnatürliche Substanz, und bei Anwendung am oder im Erdreich erfolgt ihr Abbau durch Bakterien im Erdreich so langsam, daß die Gefahr besteht, daß sie im Boden verbleibt und in einigen Fällen eine Umweltgefährdung bewirkt.

Wenn L-AMPB mit dem Syntheseverfahren hergestellt werden soll, kann AMPB zuerst in Form einer racemischen Mischung hergestellt werden. Es ist somit notwendig, L-AMPB und D-AMPB getrennt voneinander aus der racemischen Mischung zu isolieren. Das Syntheseverfahren ist daher umständlich, und die Ausbeute an L-AMPB ist gering. Dagegen kann das Verfahren zur Herstellung von L-AMPB, bei dem der Mikroorganismus oder das mikrobielle Enzym genutzt wird, ausschließlich

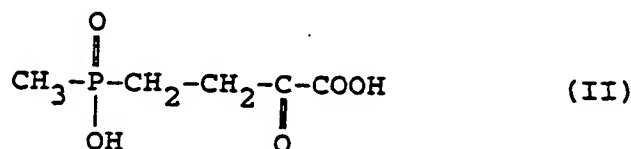
- L-AMPB liefern, die eine natürlich auftretende Substanz ist. Die natürlich auftretende L-AMPB wird als ideales Herbizid angesehen, das frei von der Gefahr einer Umweltgefährdung ist, da diejenigen Anteile der L-AMPB, die keinen Anteil an der Ausübung der Herbizidwirkung haben und noch im Erdreich verbleiben, durch Bodenbakterien leicht abgebaut und metabolisiert werden und somit nicht über lange Zeit im Erdreich verbleiben können.
- 10 Im Hinblick auf die obige Erläuterung haben wir, die Erfinder, Forschungen durchgeführt und versucht, den Vorteil des chemischen Syntheseverfahrens der Herstellung von AMPB, daß nämlich AMPB großtechnisch hergestellt werden kann, mit dem Vorteil des mikrobiologischen Verfahrens zur Herstellung von
- 15 L-AMPB, daß nämlich L-AMPB exklusiv hergestellt werden kann, zu kombinieren, so daß ein verbessertes Verfahren zur Herstellung von L-AMPB erhalten wird, mit dem L-AMPB selektiv großtechnisch hergestellt werden kann.
- 20 L-AMPB kann als eine Art von Derivaten von  $\alpha$ -Aminosäure angesehen werden. In bezug auf gewöhnliche  $\alpha$ -Aminosäuren, die normalerweise Proteine bilden, ist es bekannt, daß  $\alpha$ -Aminosäuren allgemein durch Transaminierung ihrer entsprechenden 2-Oxosäuren unter der Einwirkung von spezifischen Transaminasen gebildet werden können. Wir, die Erfinder, haben uns
- 25 daher für eine L-AMPB entsprechende 2-Oxosäure interessiert und haben eine solche 2-Oxosäure gründlich untersucht. Als Ergebnis wurde unerwartet entdeckt, daß dann, wenn 4-(Hydroxymethylphosphinyl)-2-oxobuttersäure (nachstehend OMPB
- 30 abgekürzt) mit einer bestimmten Art von Transaminase oder einem Mikroorganismus, der fähig ist, eine solche Transaminase zu erzeugen, in Gegenwart von wenigstens einem Aminodonor behandelt wird, OMPB innerhalb einer annehmbaren Reaktionszeit mit erheblicher Ausbeute zu L-AMPB umgewandelt werden kann.
- 35

### Detaillierte Beschreibung der Erfindung

Gemäß der Erfindung wird daher ein Verfahren angegeben zur Herstellung von L-2-Amino-4-(hydroxymethylphosphinyl)-Buttersäure, repräsentiert durch die Formel (I):



durch Behandeln von 4-(Hydroxymethylphosphinyl)-2-oxobuttersäure, repräsentiert durch die Formel (II):



mit Glutaminsäure oder ihrem Salz als Aminodonor für das Substrat 4-(Hydroxymethylphosphinyl)-2-oxobuttersäure in Gegenwart einer Transaminase, die fähig ist, die Substratverbindung gemäß Formel (I) in L-Amino-4-(hydroxymethylphosphinyl)-Buttersäure gemäß Formel (I) in Gegenwart von Glutaminsäure oder ihrem Salz als Aminodonor umzuwandeln, wobei die Glutaminsäure oder ihr Salz als Aminodonor in 2-Ketoglutarsäure oder ihr Salz als Nebenprodukt unter der Wirkung der Transaminase umgewandelt wird, und ist dadurch gekennzeichnet, daß die Transaminierungsreaktion des Substrats 4-(Hydroxymethylphosphinyl)-2-oxobuttersäure gemäß Formel (I) mit Glutaminsäure oder ihrem Salz als dem Aminodonor in einem wäßrigen Reaktionsmedium mit einem alkalischen pH-Wert von 8,0 bis 9,0 wirksam ist durch Umsetzen des Substrats 4-(Hydroxymethylphosphinyl)-2-oxobuttersäure in ihrer ursprünglichen hohen Konzentration mit Glutaminsäure oder ihrem Salz, die zu Beginn in einem Molverhältnis von 0,2 bis 3,0 mol pro 1 mol des Substrats (OMPb) zugesetzt wird, und

in Gegenwart von Asparaginsäure oder ihrem Salz, die zu Beginn in einem Molverhältnis von 1,0 bis 3,0 mol pro 1 mol des Substrats (OMPB) zugesetzt wird, und in Gegenwart von in Kultur gezüchteten Zellen eines Mikroorganismus, der fähig ist, eine Transaminase mit einer enzymatischen Aktivität zu erzeugen, um das Substrat (OMBP) in das gewünschte Produkt L-2-Amino-4-(hydroxymethylphosphinyl)-Buttersäure in Gegenwart von Glutaminsäure oder ihrem Salz als Aminodonor umzuwandeln, und der außerdem fähig ist, eine Transaminase mit einer GOT-Aktivität zu erzeugen, um die als Nebenprodukt erhaltene 2-Ketoglutarsäure oder ihr Salz zu Glutaminsäure oder ihrem Salz in Gegenwart von Asparaginsäure oder ihrem Salz, die als zweiter Aminodonor wirkt, um ihre Aminogruppe an die 2-Ketoglutarsäure abzugeben, zu regenerieren.

Gemäß einer Weiterentwicklung des Verfahrens nach der Erfindung wird die Substratverbindung (OMPB) in ihrer ursprünglichen hohen Konzentration von 0,1 bis 100 mg/ml in dem wäßrigen Reaktionsmedium gelöst.

Gemäß noch einer anderen Weiterentwicklung des Verfahrens nach der Erfindung wird die Transaminierungsreaktion bei einer Temperatur in einem Bereich zwischen Raumtemperatur und 60 °C durchgeführt.

Bei der Durchführung des Verfahrens nach der Erfindung wird die Transaminase oder der Mikroorganismus, der fähig ist, Transaminase zu erzeugen, zur Reaktion mit OMPB und der Aminodonor-Verbindung in einem wäßrigen flüssigen Reaktionsmedium veranlaßt, das OMBP und die Verbindung, die fähig ist, als Aminodonor zu wirken, darin gelöst enthält.

Bei dem Verfahren gemäß der Erfindung kann es im allgemeinen bevorzugt werden, die Umwandlungsreaktion von OMPB zu L-AMPB durchzuführen, während gleichzeitig das Reaktionsmedium auf einen pH-Wert im Bereich von 7,5 oder höher, bevorzugt in

einem Bereich von 8,0 bis 9,0 eingestellt wird. Die pH-Einstellung kann erfolgen durch die Zugabe von Natriumhydroxid oder einer geeigneten Pufferlösung. Erwünschte Reaktionsbedingungen können so eingestellt werden, daß die Temperatur und der pH-Wert des Reaktionsmediums in Temperatur- und pH-Bereiche fallen, die für die Wirkung der Transaminase oder des Transaminase-erzeugenden Mikroorganismus, der an der Reaktion teilnimmt, optimal sind. Gewöhnlich wird es bevorzugt, die Reaktion bei einer Temperatur in einem Bereich zwischen Raumtemperatur und 60 °C, bevorzugt zwischen 25 °C und 50 °C durchzuführen.

Die als Ausgangsverbindung eingesetzte OMPB ist eine bekannte Substanz. Die Herstellung und die physikalisch/chemischen Eigenschaften von OMPB sind beispielsweise in der JP-Patentanmeldung, Erstveröffentlichung "Kokai" 92897/81 oder in der US-PS 4 399 287 beschrieben. Bei dem Verfahren gemäß der Erfindung wird die OMPB-Ausgangsverbindung gewöhnlich in dem Reaktionsmedium bei einer ursprünglichen OMPB-Konzentration bevorzugt in einem Bereich von 0,10 bis 100 mg/ml zu Beginn der Reaktion gelöst.

Gemäß einer anderen Weiterentwicklung des Verfahrens gemäß der Erfindung ist der eingesetzte Mikroorganismus, der fähig ist, die Transaminase zu erzeugen, ausgewählt aus *Streptomyces hygroscopicus* SF-1293 FERM BP-130 oder ATCC 21705, *Streptomyces hygroscopicus* NP-50 FERM BP-1368, *Streptomyces lividans* 66 FERM BP-737, *Streptomyces albus* IFO 13014 (ATCC 3004), *Streptomyces griseus* IFO 12875 (ATCC 23345), *Streptovericillium cinnamoneum* IFO 12852 (ATCC 11874), *Streptomyces morookaensis* IFO 13416 (ATCC 19166), *Nocardia mediterranei* ATCC 21271, *Nocardiopsis dassonvillei* JCM 3237, *Streptomyces viridochromogenes* IFO 13347 (ATCC 14920), *Streptomyces viridochromogenes* JCM 4977, *Micromonospora carbonaceae* NRRL 2972 (ATCC 27114), *Escherichia coli* ATCC 10798, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Pseudomonas cepacia* ATCC 17759, *Serratia marcescens* ATCC 13880 und *Mucor spinescens* IAM Mu3.

Bevorzugte Beispiele des bei dem Ablauf des Verfahrens nach der Erfindung verfügbaren Mikroorganismus können folgende aufweisen: *Streptomyces hygrosopicus* Stamm SF-1293 (FERM BP-130 oder ATCC 21705; siehe JP-Patentveröffentlichung 639/76 oder US-PS 3 832 394), der als ein SF-1293-Substanz produzierender Stamm von *Streptomyces* bekannt ist, und seinen mutierten Stamm *Streptomyces hygrosopicus* Stamm NP-50 (FERM P-7804 oder FERM BP-1368; siehe JP-Patentanmeldung, Erstveröffentlichung "Kokai" 58589/86, oder EP-Patentanmeldung Veröffentlichungs-Nummer 0 173 327) sowie *Streptomyces lividans* Stamm 66 (FERM BP-737; siehe JP-Patentanmeldung, Erstveröffentlichung "Kokai" 175889/84, oder EP-Patentanmeldung Veröffentlichungs-Nummer 0 196 375). Außerdem können alle anderen Mikroorganismen eingesetzt werden, solange sie jeweils ein Enzym produzieren können, das die Transaminase-Aktivität hat, die fähig ist, OMPB zu L-AMPB in Gegenwart des Aminodonors umzuwandeln.

Mikrobiologische Charakteristiken des Stamms *Streptomyces hygrosopicus* SF-1293 sind in der JP-Patentveröffentlichung 639/76 oder in der US-PS 3 832 394 beschrieben. Der *Streptomyces hygrosopicus* Stamm NP-50 (FERM BP-1368) hat die gleichen mikrobiologischen Charakteristiken wie der vorgenannte Stamm SF-1293, aber der genetische Charakter des Stamms NP-50 unterscheidet sich von dem des Stamms SF-1293 dadurch, daß der Stamm NP-50 die biosynthetische Fähigkeit zur Erzeugung der SF-1293-Substanz nicht aufweist (siehe JP-Patentanmeldung, Erstveröffentlichung "Kokai" 58589/86, oder die EP-Patentanmeldung Veröffentlichungs-Nummer 0 173 327).

Ferner sind die mikrobiologischen Eigenschaften von *Streptomyces lividans* Stamm 66 (FERM BP-737) in der JP-Patentanmeldung, Erstveröffentlichung "Kokai" 175889/84, beschrieben. Unter den oben genannten mikrobiellen Spezies sind diejenigen mit den FERM P-Nummern in einer öffentlichen japanischen Hinterlegungsstelle hinterlegt und aufbewahrt, und zwar dem "Fermentation Research Institute, Agency of Industrial



Scienc & Technology, Ministry of International Trade and Industry", 1-3, Higashi 1-chome, Yatabe-machi, Tsukuba-gun, Ibaraki-ken, Japan, und diejenigen mit der FERM BP-Nummer sind in derselben öffentlichen japanischen Hinterlegungs-  
5 stelle unter dem Budapester Abkommen hinterlegt und aufbewahrt.

Das bei dem Verfahren nach der Erfindung brauchbare Enzym, d. h. die Transaminase, kann jede Transaminase sein, solange  
10 sie die Transaminase-Aktivität hat, die fähig ist, OMPB in Gegenwart des Aminodonors in L-AMPB umzuwandeln.

Bevorzugte Beispiele der bei dem Verfahren nach der Erfindung brauchbaren Transaminase können eine handelsübliche  
15 Glutamat-Oxalessigsäure-Transaminase (gewöhnlich GOT abgekürzt) (International Enzyme Classification Nr. EC 2,6,1,1) und eine handelsübliche Glutamat-Pyruvinsäure-Transaminase (gewöhnlich GPT abgekürzt) (International Enzyme Classification Nr. EC 2,6,1,2) sowie solche Enzyme sein, die die  
20 Transaminase-Aktivität haben, die fähig ist, OMPB in Gegenwart von L-Glutaminsäure als Aminodonor zu L-AMPB umzuwandeln. Diese Transaminasen können entweder für sich oder in Kombination von zwei oder mehreren davon eingesetzt werden. Davon ist eine bevorzugte Kombination der Transaminasen eine  
25 Kombination oder ein System aus einer Transaminase, die außerdem die enzymatische Aktivität zur Umwandlung von 2-Ketoglutarinsäure zu Glutaminsäure in Gegenwart von Asparaginsäure als Aminodonor hat, also eine Transaminase, die außerdem eine sogenannte GOT-Aktivität hat, und aus einem zweiten Enzym,  
30 das die Transaminase-Aktivität zur Umwandlung von OMPB in Gegenwart von Glutaminsäure als Aminodonor zu L-AMPB hat.

Beispielsweise ist es möglich, als eine Transaminase mit sogenannter GOT-Aktivität die handelsübliche Glutaminsäure-Oxalessigsäure-Transaminase (International Enzyme Classification EC 2,6,1,1) oder eine Transaminase zu verwenden, die  
35 ebenfalls die GOT-Aktivität hat und die nach einem herkömm-

lichen Verfahren aus einem Mikroorganismus mit GOT-Aktivität extrahiert worden ist, beispielsweise aus *Streptomyces hygroscopicus* Stamm SF-1293 (siehe JP-Patentanmeldung, Erstveröffentlichung "Kokai" 47485/82; FERM BP-130; ATCC 21705).

5 Diese Transaminasen, die auch die GOT-Aktivität haben, können wiederum entweder für sich oder in Kombination eingesetzt werden. Als zweite Transaminase, die OMPB zu L-AMPB in Gegenwart von L-Glutaminsäure als Aminodonor umwandeln kann und die in Kombination mit der Transaminase eingesetzt wird,  
10 die auch die sogenannte GOT-Aktivität hat, kann jede Transaminase eingesetzt werden, solange sie OMPB in Gegenwart von L-Glutaminsäure zu L-AMPB umwandeln kann.

15 Als Aminodonor-Verbindungen, die bei dem Verfahren nach der Erfindung nützlich sind, können alle bekannten Aminodonoren eingesetzt werden, wie etwa diejenigen, die in "SEIKAGAKU JIKKEN KOZA", Vol. 11, "Metabolism of Amino Acids and Bioamines", zusammengestellt von The Japanese Biochemical Society und veröffentlicht von Tokyo Kagaku Dozin Company Limited, oder in "Journal of Biological Chemistry", 247, 2486  
20 (1972), angegeben sind.

Bevorzugte Beispiele der verfügbaren Aminodonor-Verbindungen gemäß der Erfindung umfassen geradkettige L- $\alpha$ -Aminosäuren,  
25 wie z.B. L-Glutaminsäure, L-Asparaginsäure, L-Alanin, L-Methionin, L-Glutamin und dergleichen; verzweigt-kettige aliphatische L- $\alpha$ -Aminosäuren, wie z.B. L-Leucin, L-Isoleucin, L-Valin und dergleichen; basische Aminosäuren, wie z.B. L-Lysin, L-Ornithin, L-Histidin und dergleichen; sowie aromatische Aminosäuren, wie z.B. L-Phenylalanin, L-Tyrosin, L-Tryptophan und dergleichen, und Alkalimetallsalze, wie z.B. Natrium- oder Kaliumsalz dieser Aminosäuren. Außerdem können  
30 den vorgenannten L-Aminosäuren entsprechende D-Aminosäuren gleichermaßen als Aminodonor bei dem vorliegenden Verfahren eingesetzt werden. Diese Aminodonoren können entweder einzeln oder in Kombination eingesetzt werden. Es wird bevorzugt, als Aminodonor Glutaminsäure oder ein Salz davon in  
35

Kombination mit Asparaginsäure oder einem Salz davon einzusetzen. Das Molverhältnis der Menge des Aminodonors zu der Menge von OMPB, die in dem Reaktionsmedium anwesend ist, kann im allgemeinen in einem Bereich von 10:1 bis 1:10 vor  
5 Auslösung der Reaktion liegen.

Wenn Glutaminsäure und/oder Asparaginsäure als Aminodonor(en) bei dem Verfahren nach der Erfindung eingesetzt werden, können handelsübliche Glutaminsäure oder Asparaginsäure  
10 als solche eingesetzt werden. Im allgemeinen können diese Aminosäuren jeweils in Form eines Gemischs des D-Isomeren und des L-Isomeren vorliegen. Ihre L-Isomeren werden aber bevorzugt. Als Salze von Glutaminsäure und Asparaginsäure können ihre Alkalimetallsalze, insbesondere ihre Natrium-  
15 oder Kaliumsalze eingesetzt werden.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens gemäß der Erfindung werden Glutaminsäure (oder ihr Salz) und Asparaginsäure (oder ihr Salz) in Kombination eingesetzt. Die  
20 jeweiligen Konzentrationen dieser Aminodonor-Verbindungen und das Verhältnis der Aminodonor-Verbindungen zu OMPB können bevorzugt wie nachstehend beschrieben eingestellt werden. Wenn diese Aminodonoren in höheren Verhältnissen als OMPB vorgesehen sind, so daß eine größere Menge des Aminodonors als OMPB in dem Reaktionsmedium vorhanden ist, können  
25 die Reaktionsgeschwindigkeit und die Umwandlungsrate von OMPB zu L-AMPB zunehmen. Ein geeignetes Verhältnis der Aminodonor-Verbindung zu OMPB kann aber vom wirtschaftlichen Standpunkt aus eingestellt werden. Im allgemeinen können das  
30 Molverhältnis der Konzentration (oder der zuzusetzenden Menge) von Glutaminsäure oder ihrem Salz zu der Konzentration (oder der zuzusetzenden Menge) von OMPB bevorzugt in einem Bereich von 0,2:1 bis 3,0:1 liegen. Andererseits kann das Molverhältnis der Konzentration (oder der zuzusetzenden  
35 Menge) von Asparaginsäure oder ihrem Salz zu der Konzentration (oder der zuzusetzenden Menge) von OMPB vorteilhaft in einem Bereich von 1,0:1 bis 3,0:1 liegen.

Wenn ein Transaminase-erzeugender Mikroorganismus mit OMPB der Formel (II) und dem Aminodonor bei dem Verfahren nach der Erfindung umzusetzen ist, kann das Verfahren auf solche Weise durchgeführt werden, daß der Mikroorganismus zuerst in

5 einem Kulturmedium gezüchtet wird, das bei der gewöhnlichen Züchtung von Mikroorganismen nützliche Nährstoffe enthält. Es ist möglich, als Nährstoffquellen alle herkömmlichen Nährstoffquellen zu verwenden, die bei der normalen Züchtung von Mikroorganismen in Kultur verwendet werden. Als Nähr-

10 stoff-Kohlenstoffquelle kann beispielsweise Glucose, Stärke, Glyzerin, Sucrose, dicker Malzsyrop, Melasse oder dergleichen eingesetzt werden. Sie können entweder einzeln oder in Kombination eingesetzt werden. Als Nährstoff-Stickstoff-

15 quelle kann beispielsweise Sojamehl, Weizenkeime, Fleischextrakt, Pepton, Trockenhefe, Maiseinweichflüssigkeit, Ammoniumsulfat und dergleichen entweder einzeln oder in Kombination eingesetzt werden. Es ist außerdem zu empfehlen, dem Kulturmedium ein oder mehrere anorganische Salze, z.B. wie Calciumcarbonat, Natriumchlorid, Kaliumchlorid und Phosphate

20 je nach Bedarf zuzufügen. Als Kultivierungsmethode für den Mikroorganismus ist die Flüssigkulturmethode, insbesondere die Submerskultivierungsmethode am besten geeignet. Die Kultivierung des Mikroorganismus kann unter aeroben Bedingungen stattfinden. Die für die Kultivierung geeignete Temperatur

25 kann zwischen 25 °C und 40 °C liegen. Die Kultivierung kann zweckmäßig über 1 bis 4 Tage bei Actinomyceten, 1 bis 2 Tage bei Bakterien, 1 bis 2 Tage bei Hefen und 1 bis 4 Tage bei Pilzen (Schimmelpilzen) ablaufen.

30 Der resultierende Nährboden des so kultivierten Transaminase-produzierenden Mikroorganismus kann als solcher eingesetzt werden. Falls gewünscht, können die Mikrobenzellen von dem Nährboden getrennt und dann mit Wasser oder physiologischer Kochsalzlösung gewaschen werden. Die resultierenden gewaschen, intakten Zellen können dann in einer geeigneten Zellkonzentration in einem Volumen von Wasser, physiologischer Kochsalzlösung oder einer geeigneten wäßrigen Puf-

35

ferlösung suspendiert werden, um eine gebrauchsfertige Zellsuspension zu ergeben. Dem Nährboden oder der wäßrigen flüssigen Suspension, die die Zellen des verwendeten Mikroorganismus enthält, werden dann OMPB (ein erstes Substrat) und  
5 die Aminodonor-Verbindung (ein zweites Substrat für das Enzym) entweder gleichzeitig oder nacheinander zugefügt.

Das resultierende flüssige Gemisch wird dann unter solchen Bedingungen gehalten, daß der Mikroorganismus mit OMPB reagieren kann und der Aminodonor die Umwandlungsreaktion von  
10 OMPB zu L-AMPB durchführen kann. Die Zellkonzentration und die Konzentration der OMPB und des Aminodonors in dem wäßrigen flüssigen Reaktionsmedium, in dem OMPB und ein Aminodonor mit dem Mikroorganismus auf die beschriebene Weise be-  
15 handelt werden, um zu L-AMPB umgewandelt zu werden, sowie die Reaktionstemperatur- und pH-Bedingungen können geeignet eingestellt sein, um das Reaktionsmedium unter solchen Bedingungen zu halten, daß die Umwandlungsreaktion von OMPB zu  
20 L-AMPB effizient abläuft und der Mikroorganismus seine Wirkung zeigen kann. Die Reaktionsdauer kann ebenfalls eingestellt werden, um eine erhebliche Menge von L-AMPB in dem Reaktionsgemisch herzustellen und zu akkumulieren.

Wenn dagegen bei dem Verfahren der Erfindung OMPB und die  
25 Aminodonor-Verbindung mit Transaminase(n) zu behandeln sind, werden OMPB und der (die) Aminodonor(en) einer Enzymlösung geeigneter Transaminase(n) in Wasser oder einer gepufferten Lösung zugegeben und darin gelöst, gefolgt von der Durchführung der enzymatischen Reaktion von OMPB. Die jeweiligen  
30 Konzentrationen der Transaminase(n), von OMPB und dem (den) Aminodonor(en) in dem Reaktionssystem sowie die Reaktionstemperatur- und pH-Bedingungen können zweckmäßig auf ihre optimalen Bereiche eingestellt werden, in denen die Umwandlungsreaktion von OMPB zu L-AMPB mit gutem Wirkungsgrad ab-  
35 läuft.

Als Transaminase kann eine Transaminase eingesetzt werden, die handelsüblich in Form eines Enzymprodukts erhältlich ist. Alternativ ist es auch möglich, entweder eine solche wäßrige Rohenzymlösung, die direkt aus einem Nährboden eines Actinomyceten, eines Bakteriums, eines Pilzes oder einer Hefe erhalten ist, als Transaminase-erzeugenden Mikroorganismus einzusetzen, der bei der Erfindung brauchbar ist, indem die Zellen des Mikroorganismus in dem Nährboden aufgeschlossen werden, oder eine wäßrige Lösung eines Rohenzymprodukts in Wasser einzusetzen. Die wäßrige Rohenzymlösung kann auch in Form eines wäßrigen Extrakts der aufgeschlossenen Zellen des Mikroorganismus eingesetzt werden.

Eine solche Rohenzymlösung, die aus dem oben beschriebenen Mikroorganismus oder seinem Nährboden mit einem bekannten Verfahren, wie etwa Ultraschallbehandlung oder Lysozymbehandlung der Zellen erhalten ist, kann auch bei dem Verfahren der Erfindung eingesetzt werden, solange die Rohenzymlösung die Fähigkeit hat, L-AMPB aus OMPB in Gegenwart des (der) Aminodonors(en) zu erzeugen. Es erübrigt sich zu sagen, daß eine wäßrige Lösung des Enzyms in gereinigter Form ebenfalls verwendet werden kann. Es ist bekannt, daß die Stabilität und funktionelle Effizienz eines Enzyms oder Mikroorganismus gesteigert werden kann durch Immobilisieren desselben mit Hilfe eines organischen Lösungsmittels, eines Vernetzungsmittels und Trägers oder dergleichen. Eine immobilisierte Transaminase oder ein immobilisierter, Transaminase-erzeugender Mikroorganismus, der mit einem solchen Immobilisierungsverfahren behandelt worden ist, kann auch bei dem Verfahren der Erfindung eingesetzt werden, soweit er die Fähigkeit hat, L-AMPB aus OMPB zu erzeugen.

Bei dem Verfahren der Erfindung kann die enzymatische Reaktion zur Umwandlung von OMPB zu L-AMPB mit Transaminase(n) bevorzugt bei einem pH-Wert von 7,5 oder höher, insbesondere in einem pH-Bereich von 8,0 bis 9,0 durchgeführt werden. Die Reaktionsbedingungen sollten geeignet innerhalb der Tempera-

tur- und pH-Bereiche gewählt werden, die für die Aktivität der Transaminase(n), die an der enzymatischen Reaktion beteiligt ist, optimal sind.

5 Bei einer bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens nach der Erfindung wird 4-(Hydroxymethylphosphinyl)-2-oxobuttersäure, d.h. OMPB, mit einer oder mehrerer Transaminasen oder Transaminase-erzeugenden Mikroorganismen in Gegenwart sowohl von L-Glutaminsäure oder ihrem Salz als auch L-Asparaginsäure oder ihrem Salz als Aminodonoren behandelt. Als bei  
10 dieser Ausführungsform eingesetzte Transaminase(n) wird bevorzugt ein Enzymsystem verwendet, das aus einer Kombination eines Enzyms, das die Transaminase-Aktivität zur Umwandlung von 2-Ketoglutarensäure zu Glutaminsäure in Gegenwart von L-Asparaginsäure als Aminodonor hat, d.h. eines Enzyms, das  
15 die Transaminase-Aktivität hat, die in die Kategorie der sogenannten GOT-Aktivität fällt, und eines zweiten solchen Enzyms, das die Transaminase-Aktivität hat, um OMPB zu L-AMPB in Gegenwart von L-Glutaminsäure als Aminodonor umzuwandeln, besteht.  
20

Auch dabei kann der Mikroorganismus, der bei der obigen bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens eingesetzt wird, ein Mikroorganismus sein, der fähig ist, ein Enzymsystem zu  
25 produzieren, das nicht nur eine enzymatische Aktivität zur Umwandlung von 2-Ketoglutarensäure zu Glutaminsäure in Gegenwart von L-Asparaginsäure als Aminodonor, d.h. die sogenannte GOT-Aktivität hat, sondern auch eine Transaminase-Aktivität hat, um OMPB zu L-AMPB in Gegenwart von L-Glutaminsäure als Aminodonor umzuwandeln, und dieser Mikroorganismus  
30 kann beispielsweise *Streptomyces hygroscopicus* Stamm SF-1293 (FERM BP-130 oder ATCC 21705) oder sein mutierter Stamm *Streptomyces hygroscopicus* NP-50 sein (siehe JP-Patentanmeldung, Erstveröffentlichung "Kokai" 58589/86; FERM P-7804  
35 oder FERM BP-1368).

Bei der obigen bevorzugten Ausführungsform kann vorausgesetzt werden, daß OMPB die Aminogruppe aus der Glutaminsäure (oder ihrem Salz) als einem der Aminodonoren unter der Einwirkung des vorgenannten Transaminasesystems oder Mikroorganismus empfängt, um L-AMPB zu bilden, wobei die Glutaminsäure bei Abgabe ihrer Aminogruppe zu 2-Ketoglutarsäure wird, während die Asparaginsäure (oder ihr Salz) als weiterer Aminospende seine Aminogruppe an die 2-Ketoglutarsäure unter der Einwirkung einer solchen Transaminase, die auch die GOT-Aktivität hat, abgibt, so daß 2-Ketoglutarsäure zu Glutaminsäure regeneriert werden kann und Asparaginsäure (oder ihr Salz) selbst zu Oxalessäure und schließlich zu Pyruvinsäure umgewandelt wird.

Auf diese Weise ergibt das Verfahren der Erfindung eine Reaktionslösung, die L-AMPB wie erzeugt enthält.

Zusammenfassend kann also das Verfahren gemäß der Erfindung zweckmäßig auf solche Weise durchgeführt werden, daß 4-(Hydroxymethylphosphinyl)-2-oxobuttersäure mit wenigstens einer Transaminase behandelt oder umgesetzt wird in Gegenwart von wenigstens einer Aminodonor-Verbindung, bevorzugt in Gegenwart sowohl von L-Glutaminsäure als auch L-Asparaginsäure oder ihren beiden Natriumsalzen, und zwar in einem wäßrigen flüssigen Reaktionsmedium, in dem 4-(Hydroxymethylphosphinyl)-2-oxobuttersäure und die Aminodonor-Verbindung(en) sowie die Transaminase(n) gelöst worden sind, unter alkalischen Bedingungen in einem Bereich von pH 7,5 bis pH 9,0 und bei einer Temperatur in einem Bereich von Raumtemperatur bis 60 °C. Außerdem kann das Verfahren gemäß der Erfindung zweckmäßig auf solche Weise durchgeführt werden, daß 4-(Hydroxymethylphosphinyl)-2-oxobuttersäure mit wenigstens einem Mikroorganismus behandelt oder umgesetzt wird, der fähig ist, wenigstens eine Transaminase zu erzeugen, und zwar in Gegenwart von wenigstens einer Aminodonor-Verbindung, bevorzugt in Gegenwart sowohl von L-Glutaminsäure als auch L-Asparaginsäure oder ihren beiden Natriumsalzen, in einem



wäßrigen flüssigen Reaktionsmedium, in dem 4-(Hydroxymethylphosphinyl)-2-oxobuttersäure und die Aminodonor-Verbindung(en) gelöst und die Zellen des Mikroorganismus suspendiert worden sind, unter alkalischen Bedingungen von pH 7,5 bis pH 9,0 und bei einer Temperatur in einem Bereich zwischen Raumtemperatur und 60 °C. Bei der Durchführung des Verfahrens unter Verwendung der Zellen eines Transaminaseproduzierenden Mikroorganismus können 4-(Hydroxymethylphosphinyl)-2-oxobuttersäure und Aminodonor-Verbindung(en) einem Nährboden eines zur Produktion der Transaminase fähigen Mikroorganismus, in dem die intakten Zellen des Mikroorganismus suspendiert sind, zugefügt werden, und dann wird die Wechselwirkung zwischen 4-(Hydroxymethylphosphinyl)-2-oxobuttersäure, der (den) Aminodonor-Verbindung(en) und dem Mikroorganismus bewirkt.

Auch hier kann das Verfahren der Erfindung zweckmäßig auf solche Weise durchgeführt werden, daß 4-(Hydroxymethylphosphinyl)-2-oxobuttersäure mit einem Extrakt eines Mikroorganismus, der fähig ist, wenigstens eine Transaminase zu erzeugen, und der die Transaminase enthält, in Gegenwart von wenigstens einer Aminodonor-Verbindung, bevorzugt in Gegenwart sowohl von L-Glutaminsäure als auch L-Asparaginsäure oder ihren beiden Natriumsalzen, in einem wäßrigen flüssigen Reaktionsmedium behandelt wird, in dem 4-(Hydroxymethylphosphinyl)-2-oxobuttersäure und die Aminodonor-Verbindung(en) sowie der Transaminase-enthaltende Extrakt des Mikroorganismus gelöst worden sind, unter alkalischen Bedingungen von pH 7,5 bis pH 9,0 und bei einer Temperatur in einem Bereich zwischen Raumtemperatur und 60 °C. Unabhängig davon, auf welche Weise das Verfahren der Erfindung durchgeführt wird, kann 4-(Hydroxymethylphosphinyl)-2-oxobuttersäure in ihrer ursprünglichen Konzentration von 0,1 bis 100 mg/ml in einem wäßrigen flüssigen Reaktionsmedium gelöst werden, bevor die enzymatische Reaktion abzulaufen beginnt. Und 4-(Hydroxymethylphosphinyl)-2-oxobuttersäure und die Aminodonor-Verbindung(en) können in einem Molverhältnis in

einem Bereich von 1:10 bis 10:1 in einem wäßrigen flüssigen Reaktionsmedium ursprünglich vorhanden sein, bevor die enzymatische Reaktion der Umwandlung von 4-(Hydroxymethyl-phosphinyl)-2-oxobuttersäure zu L-2-Amino-4-(hydroxymethyl-phosphinyl)-buttersäure stattfindet.

Wenn die Wechselwirkung zwischen 4-(Hydroxymethylphosphinyl)-2-oxobuttersäure (d. h. OMPB), der (den) Aminodonor-Verbindung(en) und der (den) Transaminase(n) oder den Zellen des Transaminase-erzeugenden Mikroorganismus gemäß dem Verfahren nach der Erfindung stattgefunden hat, wird eine wäßrige Reaktionslösung oder ein Reaktionsgemisch erhalten, das eine Menge von erzeugter L-2-Amino-4-(hydroxymethylphosphinyl)-buttersäure (d. h. L-AMPB), eine Menge von nichtumgesetzt verbleibender OMPB, eine Menge der eingesetzten Transaminase(n) oder der eingesetzten Zellen des Mikroorganismus enthält. Vor der Rückgewinnung von L-AMPB aus dieser Reaktionslösung oder diesem Reaktionsgemisch wird es bevorzugt, die Reaktionslösung oder das Reaktionsgemisch zu zentrifugieren, wenn es die Zellen der eingesetzten Mikroorganismen enthält. Durch diese Zentrifugierung können die mikrobiellen Zellen aus der Reaktionslösung oder dem -gemisch entfernt werden, und es wird eine Überstandslösung erhalten, die L-AMPB enthält, aber frei von den mikrobiellen Zellen ist.

Nachstehend wird die Rückgewinnung des L-AMPB-Produkts aus seiner wäßrigen Lösung beschrieben.

Die Rückgewinnung und Reinigung von L-AMPB aus ihrer so erhaltenen wäßrigen Lösung kann auf die gleiche Weise wie bei den bekannten Verfahren zur Rückgewinnung und Reinigung von L-AMPB aus dem Nährboden des L-AMPB-erzeugenden Mikroorganismus erfolgen, der nach dem bekannten Fermentverfahren zur Erzeugung von L-AMPB erhalten wird. Die genauen Abläufe zur Rückgewinnung und Reinigung von L-AMPB sind in der JP-Patentanmeldung, Erstveröffentlichung "Kokai" 47485/82 beschrieben. Beispielsweise kann die Rückgewinnung und Reini-

gung von L-AMPB aus der Reaktionslösung, wie sie bei dem Verfahren der Erfindung erhalten wird, erfolgen durch Hindurchführen der L-AMPB-enthaltenden Reaktionslösung durch eine Säule eines Kationenaustauschharzes, wie z.B. Dowex 50 W (Produkt von Röhm & Haas Co., Ltd., USA), um L-AMPB an diesem Harz zu adsorbieren, woraufhin die Harzsäule mit Wasser oder verdünnter wäßriger Ammoniaklösung eluiert wird, um Fraktionen des L-AMPB-enthaltenden Eluats zu erhalten. Die L-AMPB-enthaltenden Eluatfraktionen können dann gesammelt und unter reduziertem Druck eingeengt werden, um ein trockenes Pulver von L-AMPB zu ergeben. Die nach dem Verfahren der Erfindung erzeugte L-AMPB zeigt die gleichen physikalischen und chemischen Eigenschaften wie eine authentische Probe von L-AMPB, die nach dem bekannten Fermentverfahren gemäß der JP-Patentanmeldung, Erstveröffentlichung "Kokai" 47485/82 erhalten wird, und es ist auch beobachtet worden, daß die L-AMPB, wie sie nach der vorliegenden Erfindung hergestellt wird, die gleichen Herbizid-Aktivitäten wie die L-AMPB zeigt, die nach dem bekannten Fermentverfahren hergestellt wird, was durch einige Herbizidmethoden getestet wurde.

Die Erfindung wird nachstehend unter Bezugnahme auf die folgenden Beispiele erläutert, auf die die Erfindung nicht beschränkt ist.

#### Beispiel 1

Die Herstellung von L-AMPB wurde durch Umsetzen von verschiedenen Arten von handelsüblichen Transaminasen mit OMPB durchgeführt, die in einem Volumen einer 50 mM Phosphatpufferlösung (pH 6), die eine Aminodonor-Verbindung wie zugesetzt enthielt, gelöst war.

Bei den Experimenten, bei denen Glutaminsäure-Oxalessäure-Transaminase (GOT) (ein Produkt von Boehringer Mannheim Co., Ltd.) als Transaminase-Enzym eingesetzt wurde,

- wurden sowohl L-Asparaginsäure (Asp) als auch L-Glutaminsäure (Glu) als Aminodonoren (als Substrate zur Abgabe der Aminogruppe) dem Reaktionsmedium zugesetzt und darin gelöst. Wenn dagegen Glutaminsäure-Pyruvinsäure-Transaminase (GPT) (ein Produkt von Boehringer Mannheim Co., Ltd.) verwendet wurde, wurde L-Alanin (Ala) als der Aminodonor dem Reaktionsmedium zugesetzt und darin gelöst. Bei Verwendung von Glutaminsäuredehydrogenase (GLDH) für einen Referenztest wurden sowohl Ammoniumchlorid als auch NADH als Aminodonor zugesetzt. Zu Vergleichszwecken wurde die Erzeugung von Glutaminsäure (Glu) auch beobachtet durch Umsetzen von 2-Ketoglutarinsäure (2-KG) als Kontrollsubstrat) mit der verwendeten Transaminase.
- 15 Nach Durchführung der enzymatischen Reaktion bei 30 °C für 50 min in jedem Experiment wurde das Reaktionsgemisch für 3 min bei 100 °C erwärmt, um die Reaktion zu beenden. Das Reaktionsgemisch oder die -lösung wurde auf pH 2 durch Zugabe von verdünnter wäßriger Schwefelsäure eingestellt und zentrifugiert, um eine Überstandslösung zu erhalten. Die Mengen von L-AMPB und Glutaminsäure, wie gebildet und in der Überstandslösung anwesend, wurden von einem Aminosäure-Analysator bestimmt. Die Ergebnisse der Experimente sind in der Tabelle 1 gezeigt.

Tabelle 1

5	Verwendetes Enzym und davon zuge-setzte Menge	Substratverbin-dung und ihre Konzentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	Aminodonorverbin-dung und ihre Konzentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	Reaktions-produkt und davon herge-stellte Menge ( $\mu\text{g/ml}$ )
10	GOT (10 Einh./ ml)	OMPB 100	Asp 1000	L-AMPB 2,8
		OMPB 100	Glu 1000	L-AMPB 3,7
		2-KG 100 (Kontr.)	Asp 1000	Glu 109,3
15	GPT (4 Einh./ml)	OMPB 100	Ala 1000	L-AMPB 0,9
		2-KG 100 (Kontr.)	Ala 1000	Glu 92,7
20	GLDG (60 Einh./ ml)	OMPB 100	NADH+NH <sub>4</sub> Cl 1000	L-AMPB 1,9
25		2-KG 100 (Kontr.)	NADH+NH <sub>4</sub> Cl 1000	Glu 109,3

Aus den Resultaten der Tabelle 1 geht hervor, daß L-AMPB aus OMPB durch die enzymatische Reaktion erzeugt wurde, obwohl die Ausbeute an L-AMPB signifikant, jedoch nicht so hoch wie die Ausbeute an Glutaminsäure aus 2-Ketoglutarsäure war.

Beispiel 2

In der folgenden Tabelle 2 angegebene Test-Bakterienstämme wurden separat in 40-ml-Portionen eines Kulturmediums geimpft, das Nutrient-Nährboden (Produkt von Difco Corporation) aufwies, gefolgt von produktiver Kultivierung der Bakterien bei 28 °C für 6 h. Die resultierenden Nährböden wurden jeweils als Impfkultur verwendet und in einer Impfkulturgröße von 2 % in 40-ml-Portionen eines Kulturmediums der gleichen Zusammensetzung wie oben geimpft und bei 28 °C über Nacht kultiviert, und OMPB wurde bis zu einer Konzentration

von 100 µg/ml jedem der resultierenden Nährböden, die die Bakterienzellen enthielten, zugefügt.

Jedem der resultierenden Nährböden, die OMPB wie zugefügt enthielten, wurde außerdem Natrium-L-Aspartat auf eine Konzentration von 100 µg/ml als Aminodonor zugefügt. Die flüssigen Gemische, die den Nährboden, OMPB und Natrium-L-Aspartat aufwiesen, wurden damit bereitgestellt. Danach ließ man die enzymatische Umwandlung von OMPB zu L-AMPB bei 28 °C für 24 h ablaufen, und die Reaktionsgemische wurden auf pH 2 mit 25 % Schwefelsäure eingestellt, um die Reaktion zu beenden. Die Zellen wurden durch Zentrifugieren entfernt. Die Mengen von L-AMPB, wie gebildet in den jeweiligen erhaltenen Überstandslösungen, wurden unter Verwendung eines Aminosäure-Analysators bestimmt. Die Testergebnisse sind in der Tabelle 2 zusammengefaßt.

Tabelle 2

Getesteter Bakterienstamm	Produzierte Menge von L-AMPB (µg/ml)	GOT-Akti- vität (Potenz) der Roh- enzymlö- sung (x 10 <sup>-3</sup> Einh./ml)	Spezifische Aktivität des Enzyms (x 10 <sup>-3</sup> Einh./ mg Protein)
Escherichia coli ATCC 10798	0,8	3,8	5,4
Pseudomonas aeruginosa ATCC 10145	8,3	342,0	686,7
Serratia marcescens ATCC 13880	5,0	45,6	300,0

Aus der Tabelle 2 ist ersichtlich, daß AMPB aus OMPB mit signifikanten Ausbeuten produziert werden kann.

Ferner wurden Portionen der Nährböden, wie sie nach der oben angegebenen Kultivierung über Nacht bei 28 °C erhalten wor-

den waren, separat einer Ultraschallbehandlung unterworfen, um die Bakterienzellen aufzuschließen und Zellextrakte zu gewinnen. Die so erhaltenen Zellextrakte wurden separat zentrifugiert, um wäßrige Rohenzymlösungen zu erzeugen. Die  
 5 GOT-Aktivitätswerte (Potenz) der jeweiligen so erhaltenen Rohenzymlösungen wurden ebenfalls gemessen und sind zur Information in der Tabelle 2 angegeben. Wie die Tabelle 2 zeigt, beobachtet man eine bedeutende Korrelation zwischen den Mengen von erzeugter L-AMPB und dem gemessenen Wert der  
 10 GOT-Aktivität der Rohenzymlösung. Außerdem wurden diese Rohenzymlösungen jeweils auf ihre Proteingehalte nach der Bio-Rad-Proteinanalysemethode analysiert, und die spezifische GOT-Aktivität des in der Lösung vorhandenen Enzyms ( $\times 10^{-3}$  Einheiten/mg Protein) wurde ausgewertet und ist in  
 15 der obigen Tabelle 2 angegeben.

### Beispiel 3

*Streptomyces hygroscopicus* Stamm SF-1293 (FERM BP-130) wurde  
 20 in 10 ml eines Vorkulturmediums (enthaltend 2,0 % lösliche Stärke, 1,0 % Polypepton, 0,3 % Fleischextrakt, 0,05 % Dikaliumhydrogenphosphat; pH 7,0) inokuliert. Der genannte Stamm wurde bei 28 °C für 24 h schüttelkultiviert. Der resultierende Nährboden wurde als Impfkultur verwendet und in einer  
 25 Inokulumgröße von 2 % in ein produktives Kulturmedium (enthaltend 7,0 % Glucose, 4,4 % Bactosoyton, 0,327 % Kaliumdihydrogenphosphat, 0,0852 % Dinatriumhydrogenphosphat, 1,15 % Dotite TES, und zwar N-Tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethansulfonsäure, 0,0001 % Cobaltchlorid; pH 6,0)  
 30 geimpft, und dann erfolgte die Kultivierung des Stamms SG-1293 bei 28 °C unter Belüftung und Bewegung. Nach Kultivierung über 4 Tage wurden die Mikrobenzellen durch Zentrifugieren gesammelt und mit einer 50 mM Phosphatpufferlösung (pH 6,0) gewaschen. Die Zellen wurden dann durch Ultra-  
 35 schallbehandlung aufgeschlossen (unter Verwendung einer "KUBOTA INSONATOR" genannten Vorrichtung, 1,5 A, Dauer

1 min), gefolgt von Zentrifugieren zum Erhalt einer Rohenzymlösung.

OMPB wurde auf eine Konzentration von 100 µg/ml und L-Asparaginsäure auf eine Konzentration von 200 µg/ml der Rohenzymlösung zugesetzt. Ein weiterer Kontrolltest wurde durchgeführt unter Einsatz von 2-Ketoglutarinsäure (2-KG) als Kontrollsubstrat für die Transaminierungsreaktion. Nachdem die enzymatische Reaktion bei 30 °C für 2 h abgelaufen war, wurden die Reaktionslösungen für 3 min bei 100 °C erhitzt, um die Reaktion zu beenden. Die erhaltene Reaktionslösung wurde mit verdünnter Schwefelsäure auf pH 2 eingestellt, und eine Überstandslösung wurde durch Zentrifugieren der Reaktionslösung erhalten. Die Mengen von L-AMPB und Glutaminsäure, wie aus 2-KG gebildet, die in den Überstandslösungen vorhanden waren, wurden von einem Aminosäure-Analysator bestimmt. Testergebnisse sind in der Tabelle 3 gezeigt.

Tabelle 3

20

Substrat	Produkt und davon produzierte Menge (µg/ml)	
OMPB	L-AMPB	2,8
2-KG (Kontrolle)	Glu	67,9

25

Beispiel 4

30

(1) *Streptomyces hygroscopicus* Stamm NP-50 (FERM BP-1368) wurde in 10 ml eines Vorkulturmediums (enthaltend 2,0 % lösliche Stärke, 1,0 % Polypepton, 0,3 % Fleischextrakt, 0,05 % Dikaliumhydrogenphosphat; pH 7,0) geimpft. Der genannte Stamm NP-50 wurde bei 28 °C für 24 h schüttelkultiviert. Der resultierende Nährboden wurde als Impfkultur genutzt und in einer Inokulumgröße von 2 % in ein produktives Kulturmedium (enthaltend 7,0 % Glucose, 4,4 % Bactosoyton, 0,327 % Kaliumdihydrogenphosphat, 0,0852 % Dinatriumhydrogenphosphat,

35



1,15 % Dotite TES, 0,0001 % Cobaltchlorid; pH 6,0) geimpft, und dann erfolgte die Kultivierung des Stamms NP-50 bei 28 °C unter Belüftung und Bewegung.

- 5 (2) In einem Erlenmeyer-Kolben von 250 ml wurden 20 ml des Nährbodens von *Streptomyces hygroscopicus* Stamm NP-50, der für 3 Tage in dem obigen produktiven Kulturmedium kultiviert worden war, 30 ml einer wäßrigen OMPB-Lösung (OMPB-Konzentration: 87 mg/ml, vorher auf pH 7,0 eingestellt), 40 ml einer wäßrigen Lösung von handelsüblichem Natrium-L-glutamat  
10 (Natrium-L-glutamat-Konzentration: 170 mg/ml) und 10 ml einer 1 M Tris-HCl-Pufferlösung (pH 8,5) vereinigt. Die OMPB-Konzentration in den vereinigten Flüssigkeiten betrug ca. 26 mg/ml. Unter sanftem Schütteln des resultierenden flüssigen Gemischs bei 37 °C in dem Kolben ließ man die enzymatische Reaktion für 24 h ablaufen. Danach wurde das so erhaltene Reaktionsgemisch zentrifugiert, um die Mikrobenzellen  
15 daraus abzutrennen, und die resultierende Überstandslösung, die produziertes L-AMPB (100 ml) enthielt, wurde in einem Aminosäure-Analysator analysiert, um die Menge von L-AMPB in  
20 der Lösung zu bestimmen. Es wurde gefunden, daß 14 mg/ml L-AMPB hergestellt worden waren.

- Zusätzlich wurden gleichartige Experimente auch unter separatem Einsatz von L-Alanin oder Natrium-L-aspartat als  
25 Aminodonoren (wie zugesetzt auf eine Konzentration von 170 mg/ml) durchgeführt. Es wurde beobachtet, daß 2,8 mg/ml L-AMPB bei Verwendung von L-Alanin und 1,5 mg/ml L-AMPB bei Verwendung von L-Aspartat produziert wurden.

- 30 (3) Die Überstandslösung (100 ml), die durch Zentrifugieren des Reaktionsgemischs erhalten wurde, das bei Verwendung von Natrium-L-glutamat als Aminodonor in dem obigen Verfahren (2) gebildet wurde, wurde auf eine Säule aus 400 ml eines Kationenaustauschharzes "Dowex 50 W x 2" (H<sup>+</sup>-Form) (Warenname; Produkt von Röhm & Haas Co.) aufgegeben, gefolgt von  
35 dem Entwickeln mit verdünntem wäßrigem Ammoniak. Die L-AMPB

enthaltenden Fraktionen des Eluats wurde aufgefangen und  
ingeengt. Die konzentrierte Lösung wurde dann der Chromatographie auf einer Anionenaustauschharzsäule aus 150 ml  
"Dowex 1 x 2" ( $\text{CH}_3\text{COO}^-$ -Form) (Warenname; Produkt von Röhm &  
5 Haas Co.) unterzogen. Nach dem Waschen der Harzsäule mit  
Wasser wurde die Säule mit einer 0,3 N wäßrigen Essigsäure-  
lösung eluiert.

Die L-AMPB enthaltenden Fraktionen des Eluats wurden unter  
10 reduziertem Druck bis zur Trockne eingeengt, gefolgt von ei-  
nem Trocknen im Vakuum, um 720 mg L-AMPB als weißes Pulver  
zu erhalten. Das weiße Pulver wurde aus Methanol rekristal-  
lisiert. Die so erhaltenen Kristalle wurden auf eine übliche  
Weise analysiert, d. h. durch Bestimmen der Elementarana-  
15 lyse, der spezifischen optischen Rotation, des Schmelz-  
punkts, des IR-Absorptionsspektrums, des NMR-Spektrums und  
des Massenspektrums. Es wurde bestätigt, daß die erhaltenen  
L-AMPB-Kristalle mit einer authentischen Probe von L-AMPB  
vollkommen identisch waren.

20

#### Beispiel 5

(1) Der Kulturboden (20 ml) von *Streptomyces hygroscopicus*  
Stamm NP-50 (FERM BP-1368), der in dem produktiven Kulturme-  
25 dium kultiviert wurde, das in Schritt (1) von Beispiel 4  
verwendet wurde, wurde in ein 30-ml-Zentrifugenglas ver-  
bracht und dann mit 3000 U/min für 10 min zentrifugiert.  
Ausgefällte Zellen des Stamms NP-50 wurden in 30 ml einer  
50 mM Tris-HCl-Pufferlösung (pH 8,5) suspendiert, um die  
30 Zellsuspension herzustellen. In einem Erlenmeyer-Kolben von  
250 ml wurden 20 ml der Zellsuspension, 30 ml einer wäßrigen  
OMP-B-Lösung (OMP-B-Konzentration: 87 mg/ml, vorher auf pH 7,0  
eingestellt), 40 ml einer wäßrigen Lösung von handelsübli-  
chem Natrium-L-glutamat (Natrium-L-glutamat-Konzentration:  
35 170 mg/ml) und 10 ml einer 1 M Tris-HCl-Pufferlösung (pH  
8,5) vereinigt. Die OMP-B-Konzentration in den vereinigten  
Flüssigkeiten war ca. 26 mg/ml. Unter leichtem Schütteln des

resultierenden flüssigen Gemischs bei 37 °C ließ man die enzymatische Reaktion für 24 h ablaufen. Danach wurde das so erhaltene Reaktionsgemisch zentrifugiert, um die Mikrobenzellen daraus abzutrennen, und die resultierende Überstandslösung, die produziertes L-AMPB (100 ml) enthielt, wurde in einem Aminosäure-Analysator analysiert, um die Menge von L-AMPB in der Lösung zu bestimmen. Es wurde gefunden, daß 15 mg/ml L-AMPB hergestellt worden waren.

(2) Auf die gleiche Weise wie in Schritt (3) von Beispiel 4 wurde L-AMPB-enthaltende Überstandslösung (100 ml), die in dem obigen Schritt (1) erhalten worden war, auf einer Säule aus 400 ml eines Kationenaustauschharzes "Dowex 50W x 2" ( $H^+$ -Form) chromatographiert, gefolgt von einem Entwickeln mit einem verdünnten wäßrigen Ammoniak. Bei der Nachbehandlung der L-AMPB-enthaltenden Fraktionen des Eluats auf die gleiche Weise wie in Schritt (3) von Beispiel 4 wurden 750 mg L-AMPB als weißes Pulver erhalten.

#### 20 Beispiel 6

(1) Der Nährboden (20 ml) von *Streptomyces hygroscopicus* Stamm NP-50 (FERM BP-1368), der in dem in Schritt (1) von Beispiel 4 verwendeten produktiven Kulturmedium gezüchtet worden war, wurde in ein 30-ml-Zentrifugenglas verbracht und mit 3000 U/min für 10 min zentrifugiert. Ausgefällte Zellen des Stamms NP-50 wurden in 30 ml einer 50 mM Tris-HCl-Pufferlösung (pH 8,5) suspendiert, um die Zellsuspension herzustellen. Nach Aufschließen der Zellen in der Zellsuspension für 10 min mit einem Ultraschall-Desintegrator wurde die resultierende Suspension mit 10 000 U/min für 10 min zentrifugiert, um 20 ml einer Rohenzymlösung als Überstandslösung zu ergeben.

(2) In einem Erlenmeyer-Kolben von 250 ml wurden 20 ml der Überstandslösung (der Rohenzymlösung), die wie oben erhalten worden war, 30 ml einer wäßrigen OMPB-Lösung (OMP-B-Konzen-

tration: 87 mg/ml, vorher auf pH 7,0 eingestellt), 40 ml einer wäßrigen Lösung von handelsüblichem Natrium-L-glutamat (Natrium-L-glutamat-Konzentration: 170 mg/ml) und 10 ml einer 1 M Tris-HCl-Pufferlösung (pH 8,5) vereinigt. Die OMPB-Konzentration in den vereinigten Flüssigkeiten betrug ca. 26 mg/ml. Unter sanftem Schütteln des resultierenden flüssigen Gemischs bei 37 °C ließ man die enzymatische Reaktion für 24 h ablaufen. Danach wurde das erhaltene Reaktionsgemisch (100 ml) in einem Aminosäure-Analysator analysiert, um die in dem Reaktionsgemisch gebildete Menge von L-AMPB zu bestimmen. Es wurde gefunden, daß 16 mg/ml L-AMPB hergestellt worden waren.

(3) Auf die gleiche Weise wie in Schritt (3) von Beispiel 4 wurde das aus der enzymatischen Reaktion des obigen Schritts (2) erhaltene Reaktionsgemisch (100 ml) auf einer Ionenaustauschharzsäule aus 400 ml "Dowex 50W x 2" (H<sup>+</sup>-Form) chromatographiert, gefolgt von einem Entwickeln mit verdünntem wäßrigem Ammoniak. Bei Nachbehandlung der L-AMPB-enhaltenen Fraktionen des Eluats auf die gleiche Weise wie in Schritt (3) von Beispiel 4 wurden 740 mg L-AMPB als weißes Pulver erhalten.

#### Beispiel 7

(1) *Streptomyces lividans* Stamm 66 (FERM BP-737) wurde in 10 ml eines Vorkulturmediums der gleichen Zusammensetzung wie des in Schritt (1) von Beispiel 4 verwendeten eingepflegt. Der obige Mikroorganismus wurde bei 28 °C für 24 h schütttelkultiviert. Der resultierende Nährboden wurde als Impfkultur verwendet und in einer Inokulumgröße von 2 % in ein produktives Kulturmedium der gleichen Zusammensetzung wie des in Schritt (1) von Beispiel 4 verwendeten eingepflegt und dann bei 28 °C unter Belüftung und Bewegung kultiviert.

(2) In einem Erlenmeyer-Kolben von 250 ml wurden 20 ml des Nährbodens von *Streptomyces lividans* Stamm 66, der für 3

Tage in dem obigen produktiven Kulturmedium kultiviert worden war, 30 ml einer wäßrigen OMPB-Lösung (OMPB-Konzentration: 87 mg/ml, vorher auf pH 7,0 eingestellt), 40 ml einer wäßrigen Lösung von handelsüblichem Natrium-L-glutamat (Natrium-L-glutamat-Konzentration: 170 mg/ml) und 10 ml einer 1 M Tris-HCl-Pufferlösung (pH 8,5) vereinigt. Die OMPB-Konzentration in den vereinigten Flüssigkeiten war ca. 26 mg/ml. Unter sanftem Schütteln des resultierenden flüssigen Gemischs bei 37 °C in dem Kolben ließ man die enzymatische Reaktion für 24 h ablaufen. Danach wurde das so erhaltene Reaktionsgemisch zentrifugiert, um die Mikrobenzellen daraus abzutrennen, und die resultierende Überstandslösung, die produziertes L-AMPB enthielt (100 ml), wurde in einem Aminosäure-Analysator analysiert, um die Menge an L-AMPB in der Überstandslösung zu bestimmen. Es wurde gefunden, daß 6 mg/ml L-AMPB erzeugt worden waren.

### Beispiel 8

(1) *Streptomyces hygroscopicus* Stamm SF-1293 (FERM BP-130; ATCC 21705) wurde in 10 ml eines Vorkulturmediums der gleichen Zusammensetzung wie des in Schritt (1) von Beispiel 4 verwendeten eingepft. Der obige Stamm SF-1293 wurde bei 28 °C für 24 h schüttelkultiviert. Der resultierende Nährboden wurde als Impfkultur verwendet und in einer Inokulumgröße von 2 % in ein produktives Kulturmedium der gleichen Zusammensetzung wie der in Schritt (1) von Beispiel 4 verwendeten geimpft, und dann wurde der Stamm SF-1293 bei 28 °C unter Belüftung und Bewegung kultiviert.

(2) In einem Erlenmeyer-Kolben von 250 ml wurden 20 ml des Nährbodens von *Streptomyces hygroscopicus* Stamm SF-1293, der für 3 Tage in dem obigen produktiven Kulturmedium kultiviert worden war, 30 ml einer wäßrigen OMPB-Lösung (OMPB-Konzentration: 87 mg/ml, vorher auf pH 7,0 eingestellt), 40 ml einer wäßrigen Lösung von handelsüblichem Natrium-L-glutamat (Natrium-L-glutamat-Konzentration: 170 mg/ml) und 10 ml ei-

ner 1 M Tris-HCl-Pufferlösung (pH 8,5) vereinigt. Die OMPB-Konzentration in den vereinigten Flüssigkeiten betrug ca. 26 mg/ml. Unter sanftem Schütteln des resultierenden flüssigen Gemischs bei 37 °C in dem Kolben ließ man die enzymatische Reaktion für 24 h ablaufen. Danach wurde das so erhaltene Reaktionsgemisch zentrifugiert, um die Mikrobenzellen daraus abzutrennen, und die resultierende Überstandslösung, die produziertes L-AMPB (100 ml) enthielt, wurde in einem Aminosäure-Analysator analysiert, um die Menge an erzeugtem L-AMPB in der Überstandslösung zu bestimmen. Es wurde gefunden, daß 7 mg/ml L-AMPB produziert worden waren.

(3) Auf die gleiche Weise wie in Schritt (3) von Beispiel 4 wurde die in dem obigen Schritt (2) erhaltene Überstandslösung (100 ml) auf einer Ionenaustauschharzsäule von 400 ml "Dowex 50W x 2" ( $H^+$ -Form) chromatographiert, gefolgt von einem Entwickeln mit einem verdünnten wäßrigen Ammoniak. Bei Nachbehandlung der L-AMPB-enthaltenden Fraktionen des Eluats auf die gleiche Weise wie in Schritt (3) von Beispiel 4 wurden 350 mg L-AMPB als weißes Pulver erhalten.

### Beispiel 9

In 100 ml einer 50 mM Tris-HCl-Pufferlösung (pH 8,5) wurde 20 g eines nassen Kuchens handelsüblicher Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*; ein Produkt von Oriental Yeast Co., Japan) suspendiert. In einem Erlenmeyer-Kolben von 250 ml wurden 20 ml der resultierende Zellsuspension der Bäckerhefe, 30 ml einer wäßrigen OMPB-Lösung (OMPB-Konzentration: 87 mg/ml, vorher auf pH 7,0 eingestellt), 40 ml einer wäßrigen Lösung von handelsüblichem Natrium-L-glutamat (Natrium-L-glutamat-Konzentration: 170 mg/ml) und 10 ml einer 1 M Tris-HCl-Pufferlösung (pH 8,5) vereinigt. Die OMPB-Konzentration in den vereinigten Flüssigkeiten betrug dann ca. 26 mg/ml. Unter Schütteln des resultierenden flüssigen Gemischs bei 37 °C für 24 h ließ man die enzymatische Umwandlung von OMPB ablaufen. Das so erhaltene Reaktionsge-

5 misch wurde zentrifugiert, um die Hefezellen daraus abzutrennen, und die resultierende Überstandslösung, die produzierte L-AMPB enthielt (100 ml), wurde in einem Aminosäure-Analysator analysiert, um die Menge L-AMPB in der Überstandslösung zu bestimmen. Es wurde gefunden, daß 6 mg/ml L-AMPB produziert worden waren.

#### Beispiel 10

10 In 50 mM Tris-HCl-Pufferlösung (pH 8,5), die 400 µg/ml OMPB und 600 µg/ml L-Glutaminsäure enthielt, die zugesetzt und gelöst worden waren, wurde eine Transaminase mit OMPB umgesetzt, um L-AMPB zu produzieren. Als Transaminase wurde eine handelsübliche Glutaminsäure-Oxalessigsäure-Transaminase  
15 (GOT) (ein Produkt von Boehringer Mannheim Co.) eingesetzt. Die GOT-Konzentration wurde auf 40 Einheiten/ml eingestellt. Nach Ablauf der enzymatischen Reaktion bei 37 °C für 24 h wurde die resultierende Reaktionslösung für 3 min bei 100 °C erhitzt, um die Reaktion zu beenden. Danach wurde die Reaktionslösung mit verdünnter Schwefelsäure auf pH 2 einge-  
20 stellt und dann zentrifugiert, um die unlöslichen Feststoffe zu entfernen und eine Überstandslösung zu erhalten. Die Menge von L-AMPB in der Überstandslösung wurde von einem Aminosäure-Analysator bestimmt. Dieser war ein Modell  
25 "MLC-703" von ATTO CORPORATION, Japan, und die Verweildauer war auf 12 min eingestellt. Es wurde gefunden, daß 100 µg/ml L-AMPB in der Überstandslösung produziert worden waren.

#### Beispiel 11

30

##### (1) Kultivierungsmethode:

Mehrere Spezies von Mikroorganismen, die in den folgenden Tabellen 4 bis 8 aufgeführt sind, wurden von ihren jeweiligen Impfkulturplatten in Volumina (10-ml-Portionen) eines  
35 flüssigen Kulturmediums (enthaltend 0,5 % Glucose, 0,3 % Hefeextrakt, 1,0 % Fleischextrakt, 1,0 % Pepton, 0,3 % Natriumchlorid; pH 7,0), das in großvolumige Reagenzgläser einge-

bracht war, inokuliert. Ein Stück Edelstahlknäuel wurde ebenfalls in solche Reagenzgläser eingebracht, die für die Kultivierung der Actinomyceten verwendet wurden. Die inokulierten Mikroorganismen wurden dann separat bei 28 °C für 24 h (oder 48 h) auf Glasschüttlern kultiviert.

(2) Herstellung von Zellproben:

Nach der Kultivierung wurden 1-ml-Portionen der resultierenden Nährböden (ausgenommen 0,2-ml-Portionen der Pilzkultur im Fall der Pilze) jeweils in Mikroteströhrchen (Produkt von Eppendorf Co., Ltd.) entnommen und mit 12 000 U/min für 3 min zentrifugiert. Die Überstände wie gebildet wurden beseitigt, und die abgesetzten verbleibenden Zellen wurden jeweils als Zellproben gesammelt.

(3) Enzymatische Reaktionen:

Jeder der Zellproben, die so in die jeweiligen Mikroteströhrchen gepackt waren, wurden 20 µl Tris-HCl-Pufferlösung (1 mol, pH 8,0), 20 µl einer wäßrigen OMPB-Lösung (OMPB-Konzentration: 200 mg/ml, pH 8,0), 40 µl einer wäßrigen Lösung eines Aminodonors wie unten angegeben (der eines von Natrium-L-glutamat, Natrium-L-aspartat und L-Alanin in einer Konzentration von 1 mol/ml enthielt) und 120 µl Wasser zugefügt. Das resultierende Gemisch ließ man bei 37 °C für 24 h stehen, um die Wechselwirkung zwischen den Mikrobenzellen, der OMPB und der vorhandenen Aminodonor-Verbindung zu bewirken. Nach der Reaktion wurde das Reaktionsgemisch mit 12 000 U/min für 3 min zentrifugiert, und die Menge L-AMPB, die in der erhaltenen Überstandslösung vorhanden war, wurde gemessen durch Bestimmen der Menge von L-AMPB mit einem Aminosäure-Analysator. Testergebnisse sind in den Tabellen 4 bis 8 zusammengefaßt.



Tabelle 4

5	Eingesetzte Mikroorganismen (Bakterien)	Produzierte L-AMPB-Menge (mg/ml)		
		<u>Glu</u>	<u>Asp</u>	<u>Ala</u>
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 10798	9,8	4,2	3,3
10	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCCC 10145	8,3	3,3	3,8
	<i>Pseudomonas cepacia</i> ATCC 17759	9,6	2,4	3,0
	<i>Serratia marcescens</i> ATCC 13880	9,5	1,8	1,6

15 Tabelle 5

20	Eingesetzte Mikroorganismen (Actinomyceten)	Produzierte L-AMPB-Menge (mg/ml)		
		<u>Glu</u>	<u>Asp</u>	<u>Ala</u>
	<i>Streptomyces albus</i> IFO 13014 (ATCC 3004)	7,4	1,0	0,8
25	<i>Streptomyces griseus</i> IFO 12875 (ATCC 23345)	8,3	1,7	1,9
	<i>Streptovericillium cinnamoneum</i> IFO 12852 (ATCC 11874)	10,6	6,0	2,2
	<i>Streptomyces morookaensis</i> IFO 13416 (ATCC 19166)	6,8	7,5	3,3
30	<i>Nocardia mediterranei</i> ATCC 21271	8,1	2,6	1,6
	<i>Nocardiopsis dassonvillei</i> JCM 3237	6,3	1,5	1,5

Tabelle 6

35	Eingesetzte Mikroorganismen (Actinomyceten)	Produzierte L-AMPB-Menge (mg/ml)		
		<u>Glu</u>	<u>Asp</u>	<u>Ala</u>
40	<i>Streptomyces viridochromogenes</i> IFO 13347	9,5	1,6	1,1
	<i>Micromonospora carbonacea</i> NRRL 2972 (ATCC 27114)	6,1	1,4	1,6

45 \*Kultivierungsdauer: 48 h

Tabelle 7

5	Eingesetzte Mikroorganismen (Actinomyceten)	Produzierte L-AMPB-Menge (mg/ml)		
		<u>Glu</u>	<u>Asp</u>	<u>Ala</u>
10	Streptomyces viridochromogenes JCM 4977*	8,8	5,6	3,6

\*Bialaphos-erzeugende Actinomyceten

Tabelle 8

15	Eingesetzte Mikroorganismen (Fungi)	Produzierte L-AMPB-Menge (mg/ml)		
		<u>Glu</u>	<u>Asp</u>	<u>Ala</u>
20	Mucor spinescens IAM Mu3	5,3	0,9	1,1

\* Kultivierungsdauer: 48 h

25 Von den Spezies oder Stämmen der in den Tabellen 2 und 4 bis  
8 angegebenen Mikroorganismen wurden die Spezies oder Stämme  
mit den ATCCC-Nummern bei der "American Type Culture Collec-  
tion", Washington D.C., USA, hinterlegt und aufbewahrt; die  
Spezies oder Stämme mit den JCM-Nummern wurden bei der  
30 "Japan Collection of Microorganism", Institute of Physical  
and Chemical Research in Wako City, Saitama-ken, Japan, hin-  
terlegt und aufbewahrt; die Spezies oder Stämme mit den IAM-  
Nummern wurden bei dem "Institute of Applied Microbiology,  
University of Tokyo", Tokyo, Japan, hinterlegt und aufbe-  
wahrt; und die Spezies oder Stämme mit den IFO-Nummern wur-  
35 den bei dem "Institute for Fermentation, Osaka" in Osaka,  
Japan, hinterlegt und aufbewahrt. Sämtliche der Spezies oder  
Stämme der Mikroorganismen mit den oben angegebenen Zugangs-  
nummern sind als Kulturstämme bekannten Typs bei den oben  
angegebenen öffentlichen Hinterlegungsstellen verfügbar und  
40 erhältlich.

Beispiel 12

(1) *Streptomyces hygroscopicus* Stamm NP-50 (FERM BP-1368) wurde in 10 ml eines Vorkulturmediums (enthaltend 2,0 % lösliche Stärke, 1,0 % Polypepton, 0,3 % Fleischextrakt, 0,05 % Dikaliumhydrogenphosphat; pH 7,0) eingimpft. Der NP-50-Stamm wurde bei 28 °C für 24 h schüttelkultiviert. Der resultierende Nährboden wurde als Impfkultur verwendet und in einer Inokulumgröße von 2 % in ein produktives Kulturmedium (enthaltend 7,0 % Glucose, 3,9 % Weizenkeime, 2,5 % lösliches Vegetationsprotein, 0,3 % Kaliumdihydrogenphosphat, 0,0001 % Cobaltchlorid; pH 6,8) inokuliert. Die Kultivierung wurde dann bei 28 °C unter Belüftung und Rühren durchgeführt.

15

(2) 20-ml-Portionen des Nährbodens, der durch Kultivierung des Stamms NP-50 in dem oben genannten produktiven Kulturmedium über 3 Tage erhalten wurde und Zellen des Stamms NP-50 von *Streptomyces hygroscopicus* enthielt, wurde OMPB und Natrium-L-glutamat und Natrium-L-aspartat als die Aminodonoren in solchen Mengen zugesetzt, daß ihre jeweiligen Konzentrationen in dem resultierenden Gemisch entsprechend der folgenden Tabelle 9 zu Beginn der jeweiligen Transaminierungsreaktion erhalten wurden. Durch weitere Zugabe von 10 ml einer 1 M Tris-HCl-Pufferlösung (pH 8,5) wurde jedes der resultierenden Gemische auf pH 8,5 eingestellt, und das Volumen des resultierenden Gemischs wurde auf 100 ml gebracht. Somit war das ursprüngliche Volumen des Nährbodens fünffach verdünnt worden.

30

Man ließ dann die enzymatische Aminierungsreaktion von OMPB bei 37 °C für 24 h ablaufen unter sanftem Schütteln der resultierenden Lösung, die die darin suspendierten Zellen sowie OMPB und die darin gelösten Aminodonor-Verbindungen enthielt.

35

Nach der Reaktion wurden 100-ml-Portionen der Reaktionsgemische jeweils einer Wärmebehandlung (Sterilisierung und Inaktivierung des Enzyms) unterworfen, um die Reaktion zu beenden. Jedes Reaktionsgemisch wurde filtriert, um die Mikrobenzellen zu entfernen, und die Mengen von L-AMPB in den einzelnen erhaltenen Filtraten wurden in einem Aminosäure-Analysator ("MLC-703", Warenname, hergestellt von ATTO CORPORATION: Verweildauer 12 min) gemessen. Die Testergebnisse sind in der Tabelle 9 angegeben.

Tabelle 9

Test Nr.	Anfangs- konzentration von OMPB ( $\mu\text{g/ml}$ )	Anfangskonzentration des Aminodohors vor Beginn der Reaktion ( $\mu\text{g/ml}$ )		Endkonzentration der produzierten L-AMPB nach be- endeter Reaktion ( $\mu\text{g/ml}$ )
		Natrium-L- glutamat	Natrium-L- aspartat	
1	10 000	10 000	0	5 930
2	10 000	20 000	0	7 170
3	10 000	0	10 000	350
4	10 000	10 000	10 000	8 500
5	30 000	30 000	30 000	28 360

Aus den Ergebnissen der Tabelle 9 ist ersichtlich, daß die aus OMPB hergestellte Menge von L-AMPB bedeutend zunahm, wenn die enzymatische Aminierungsreaktion von OMPB in Gegenwart von Natrium-L-glutamat und Natrium-L-Aspartat in Kombination als Aminodonoren durchgeführt wurde, verglichen mit der Durchführung der enzymatischen Reaktion von OMPB in Gegenwart von einem von Natrium-L-glutamat oder Natrium-L-aspartat.

### Beispiel 13

Ein Nährboden von *Streptomyces hygroscopicus* Stamm NP-50, der unter den gleichen Vorkultivierungsbedingungen wie in Beispiel 12 erzeugt worden war, wurde als Impfkultur einge-

setzt und in ein Volumen des gleichen produktiven Kulturmediums wie in Beispiel 12 in einen 3-l-Flaschen-Fermenter inokuliert, gefolgt von der Durchführung der Kultivierung bei 28 °C für 3 Tage.

5

2 l des so erhaltenen Nährbodens wurden in einen Reaktions-  
tank überführt, gefolgt von der Zugabe von 300 g OMPB in den  
Nährboden. Außerdem wurden dem Kulturboden 310 g Natrium-L-  
glutamat (Produkt von Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)  
10 und 290 g Natrium-L-aspartat (Produkt von Nakarai Chemicals,  
Ltd.) zugesetzt und darin gelöst. Nach Einstellen des resul-  
tierenden Gemischs auf pH 8,5 mit wäßrigem NaOH wurde das  
Volumen des Gemischs durch Zugabe von Wasser auf 10 l er-  
höht. Damit war die Konzentration von OMPB in dem resultie-  
15 renden flüssigen Gemisch 30 000 µg/ml zu Beginn der Reak-  
tion. Die jeweiligen Konzentrationen von Natrium-L-glutamat  
und Natrium-L-aspartat waren zu diesem Zeitpunkt gleich der  
Molkonzentration von OMPB (1/6 mol). Dann ließ man die enzy-  
matische Aminierungsreaktion von OMPB bei 37 °C für 24 h ab-  
20 laufen unter sanftem Rühren des flüssigen Gemischs, das die  
Zellen des Stamms NP-50, OMPB und die Aminodonor-Verbindun-  
gen enthielt, wobei der pH-Wert auf 8,5 gehalten wurde. Nach  
der Reaktion wurde das erhaltene Reaktionsgemisch durch  
Zugabe von 50 % Schwefelsäure auf pH 3,0 eingestellt. Nach  
25 der Zugabe eines Filterhilfsmittels wurde das Reaktionsge-  
misch filtriert, um die Zellen abzutrennen, und es wurden  
9 l des Filtrats erhalten.

Die Konzentration von L-AMPB in dem Filtrat wurde auf die  
30 gleiche Weise wie in Beispiel 12 analysiert. Sie wurde mit  
29 000 µg/ml ermittelt. Das Filtrat wurde dann chromatogra-  
phiert, indem es durch eine Säule von 5 l "Dowex 50W" (H<sup>+</sup>-  
Form) als Kationenaustauscharz geleitet und anschließend mit  
Wasser entwickelt wurde. Die L-AMPB-enthaltenden Fraktionen  
35 des Eluats wurden erneut auf einer Säule von "Dowex 1 x 2"  
(CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>-Form) als Anionenaustauschharz chromatographiert,

die mit Wasser gewaschen und dann mit 0,3 N wäßriger Essigsäurelösung eluiert wurde.

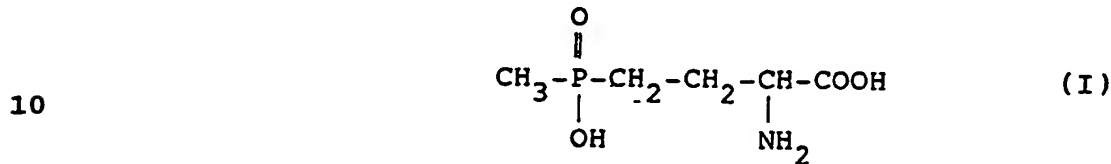
5 Die L-AMPB-enthaltenden Fraktionen des Eluats wurden unter reduziertem Druck bis zur Trockne eingeengt, gefolgt von einem Trocknen im Vakuum, um L-AMPB als weißes Pulver zu ergeben. Dieses weiße Pulver wurde aus Methanol rekristallisiert. Die Ausbeute an L-AMPB war 183 g (ca. 70 %).

10 Die so erhaltenen Kristalle von L-AMPB wurden auf die übliche Weise analysiert, d. h. durch Messen der Elementaranalyse, der spezifischen optischen Drehung, des Schmelzpunkts, des IR-Absorptionsspektrums, des NMR-Spektrums und des Massenspektrums. Es wurde bestätigt, daß der erhaltene L-AMPB-  
15 Kristall mit einer authentischen Probe von L-AMPB vollständig identisch war.

Patentansprüche

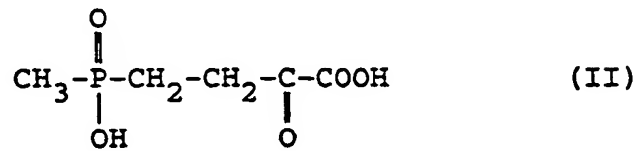
5

1. Verfahren zur Herstellung von L-2-Amino-4-(hydroxymethylphosphinyl)-buttersäure der Formel (I):



durch Umsetzen von 4-(Hydroxymethylphosphinyl)-2-oxobuttersäure der Formel (II):

15



- mit Glutaminsäure oder ihrem Salz als Aminodonor für das Substrat, 4-(Hydroxymethylphosphinyl)-2-oxobuttersäure, in Gegenwart einer Transaminase, die fähig ist, die Substratverbindung gemäß Formel (II) in L-Amino-4-(hydroxymethylphosphinyl)-buttersäure gemäß Formel (I) in Gegenwart von Glutaminsäure oder ihrem Salz als Aminodonor umzuwandeln, wobei die Glutaminsäure oder ihr Salz als Aminodonor in 2-Ketoglutarinsäure oder ihr Salz als Nebenprodukt unter der Wirkung der Transaminase umgewandelt wird,
- dadurch gekennzeichnet,
- daß die Transaminierungsreaktion des Substrats 4-(Hydroxymethylphosphinyl)-2-oxobuttersäure gemäß Formel (II) mit Glutaminsäure oder ihrem Salz als dem Aminodonor in einem wäßrigen Reaktionsmedium mit einem alkalischen pH-Wert von 8,0 bis 9,0 wirksam ist durch Umsetzen des Substrats 4-(Hydroxymethylphosphinyl)-2-oxobuttersäure in ihrer ursprünglichen hohen Konzentra-

- tion mit Glutaminsäure oder ihrem Salz, wie zu Beginn in einem Molverhältnis von 0,2 bis 3,0 mol pro 1 mol des Substrats (OMPB) zugesetzt, und in Gegenwart von Asparaginsäure oder ihrem Salz, wie zu Beginn in einem
- 5 Molverhältnis von 1,0 bis 3,0 mol pro 1 mol des Substrats (OMPB) zugesetzt, und in Gegenwart von in Kultur gezüchteten Zellen eines Mikroorganismus, der fähig ist, eine Transaminase mit einer enzymatischen Aktivität zu erzeugen, um das Substrat (OMBP) in das gewünschte Pro-
- 10 dukt L-2-Amino-4-(Hydroxymethylphosphinyl)-buttersäure in Gegenwart von Glutaminsäure oder ihrem Salz als Aminodonor umzuwandeln, und der außerdem fähig ist, eine Transaminase mit einer GOT-Aktivität zu erzeugen, um die als Nebenprodukt erhaltene 2-Ketoglutarinsäure oder ihr
- 15 Salz zu Glutaminsäure oder ihrem Salz in Gegenwart von Asparaginsäure oder ihrem Salz, die als zweiter Aminodonor wirkt, um ihre Aminogruppe an die 2-Ketoglutarinsäure abzugeben, zu regenerieren.
- 20 2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Substratverbindung (OMPB) bei ihrer ursprünglichen hohen Konzentration von 0,1 bis 100 mg/ml in dem wäßrigen Reaktionsmedium gelöst wird.
- 25 3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Transaminierungsreaktion bei einer Temperatur in einem Bereich zwischen Raumtemperatur und 60 °C durchgeführt wird.
- 30 4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei der verwendete Mikroorganismus, der fähig ist, die Transaminase zu erzeugen, ausgewählt ist aus Streptomyces hygroscopicus SF-1293 FERM BP-130 oder ATCC 21705, Streptomyces hygroscopicus NP-50 FERM BP-1368, Strepto-
- 35 myces lividans 66 FERM BP-737, Str ptomyces albus IFO 13014 (ATCC 3004), Streptomyces griseus IFO 12875 (ATCC 23345), Streptovericillium cinnamoneum IFO 12852



(ATCC 23345), Streptovericillium cinnamoneum IFO 12852  
(ATCC 11874), Streptomyces morookaensis IFO 13416  
(ATCC 19166), Nocardia mediterranei ATCC 21271, Nocar-  
5 diopsis dassonvillei JCM 3237, Streptomyces viridochro-  
mogenes IFO 13347 (ATCC 14920), Streptomyces viridochro-  
mogenes JCM 4977, Micromonospora carbonaceae NRRL 2972  
(ATCC 27114), Escherichia coli ATCC 10798; Pseudomonas  
aeruginosa ATCC 10145, Pseudomonas cepacia ATCC 17759,  
10 Serratia marcescens ATCC 13880 und Mucor spinescens IAM  
Mu3.

